

抗糖脂質抗体を用いた網膜の免疫組織化学 (図1)

上原 文行・内匠 勝秀・鷗木 一彦 (鹿児島大学医学部眼科学教室)
 鮫島 宗文・大庭 紀雄

Immunohistochemical Localization of Gangliosides in the Monkey Retina

Fumiyuki Uehara, Katsuhide Takumi, Kazuhiko Unoki,
 Munefumi Sameshima and Norio Ohba

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

要 約

抗 GM1 抗体および抗アシアロ GM1 抗体を用いてサル網膜の免疫組織化学的検索を行い、網膜における GM1 およびアシアロ GM1 の局在についてしらべた。GM1 は神経線維層、神経節細胞層、内網状層、外顆粒層および脈絡膜に分布しているのが観察されたが、アシアロ GM1 の網膜内の分布は観察されなかった。ガングリオシドは、視細胞外節・内節および視細胞間基質に局在する Cal β 1 \rightarrow 3 GalNAc 糖鎖含有複合糖質の構成要素とはなっていないものと結論した。(日眼 91: 1103—1106, 1987)

キーワード: GM1, アシアロ GM1, 網膜, 免疫組織化学

Abstract

Immunohistochemical studies revealed that the anti-GM1 antibody bound not only to the ganglion cell layer but also to the nerve fiber layer, the inner plexiform layer, the outer nuclear layer and the choroid. The anti-asialo-GM1 antibody did not bind to any layer of the retina. The photoreceptor outer segments, inner segments and the interphotoreceptor matrix did not react with either antibodies. The findings suggest that glycoconjugates possessing Cal β 1 \rightarrow 3GalNAc as the terminal sugars located in the photoreceptor outer segments, inner segments and interphotoreceptor matrix may not contain gangliosides. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 1103—1106, 1987)

Key words: GM1, Asialo-GM1, Retina, Immunohistochemistry

I 緒 言

複合糖質の一種であるスフィンゴ糖脂質は、糖タンパクと共に生命現象に深く関与している物質で、その分解酵素の欠損は先天性脂質代謝異常症として知られる。網膜においては、神経節細胞に糖脂質が蓄積することにより、cherry red spot と呼ばれる眼底病変がひき起こされることが報告されている¹⁾²⁾。網膜における各種スフィンゴ糖脂質の解剖学的局在については、上記蓄積症の病理組織学的検索結果から間接的知見が得られているにすぎない¹⁾²⁾。

一方、筆者らはこれまで網膜の複合糖質に関する研究を進めてきたが、ピーナツレクチン(以下 PNA)を用いた網膜の組織化学的検索により、ガラクトース β 1 \rightarrow 3 N-アセチルガラクトサミン(以下 Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc)を糖鎖非還元末端に有する複合糖質が、錐体視細胞の内節・外節およびその周囲の視細胞間基質(以下 IPM)に特異的に局在することを報告した³⁾。さらに杆体視細胞の内節・外節およびその周囲の IPM にも Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc を鎖構造に有する複合糖質が存在するのであるが、通常はその末端にシアル酸が結合しているために PNA に反応しないことを明らかにし

別刷請求先: 890 鹿児島市宇宿町1208-1 鹿児島大学医学部眼科学教室 上原 文行

Reprint requests to: Fumiyuki Uehara, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kagoshima Univ. Faculty of Med.
 1208-1 Usuki-cho, Kagoshima 890, Japan

(昭和62年6月16日受付) (Accepted June 16, 1987)

た⁴⁾⁵⁾。これらの Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc 含有複合糖質は、電気泳動的解析などから主として糖タンパクであろうと推定しているが⁶⁾⁷⁾、糖脂質を含んでいる可能性も否定できない。とくにガングリオ系列のスフィンゴ糖脂質である GM1 およびアシアロ GM1 は糖鎖末端構造に Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc を有することから⁸⁾、上記複合糖質の構成要素となっている可能性がある。

今回、GM1 およびアシアロ GM1 に対する抗体を用いた網膜の免疫組織化学的検索を行うことにより、それらの網膜内局在分布について検討するとともに、視細胞内節・外節および周囲の IPM に局在する Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc 含有複合糖質の構成要素となっているかどうかについても考察した。

II 方 法

ケタラル麻酔下に摘出した、ニホンザル (*Macaca fuscata*)、4 眼を使用した。パッファーホルマリン (10%ホルマリン、4%リン酸緩衝液 pH 7.45) にて 4 時間固定したのち、2 眼は液体窒素中で迅速凍結し、

cryostat (Damon/IED, USA) を用い 8 μ m の切片を作製した。2 眼は、アルコール脱水ののち、パラフィン包埋し、5 μ m の切片を作製した。

抗糖脂質抗体として、抗 GM1 家兎血清および抗アシアロ GM1 家兎血清 (生化学工業) を用いた。コントロールとして非免疫家兎血清を用いた。網膜の凍結切片およびパラフィン包埋切片を、2%ウシアルブミン・PBS にて 5 分間処理したのち、それぞれに一次抗体として抗 GM1 家兎血清；抗アシアロ GM1 家兎血清；コントロール家兎血清 (50 倍希釈・PBS) のいずれかを、室温にて 30 分間浸漬させた。PBS で洗浄ののち、二次抗体として FITC 標識抗家兎 IgG (カッペル社, USA；100 倍希釈・PBS) をそれぞれの切片に、室温にて 30 分間浸漬させた。PBS で洗浄ののち、蛍光顕微鏡 (青色励起) 下でそれぞれの切片の蛍光分布、強さについて観察した。抗体浸漬切片とコントロール切片との間で、蛍光の強度に差のみられた部位を特異的抗体反応部位と判定した。

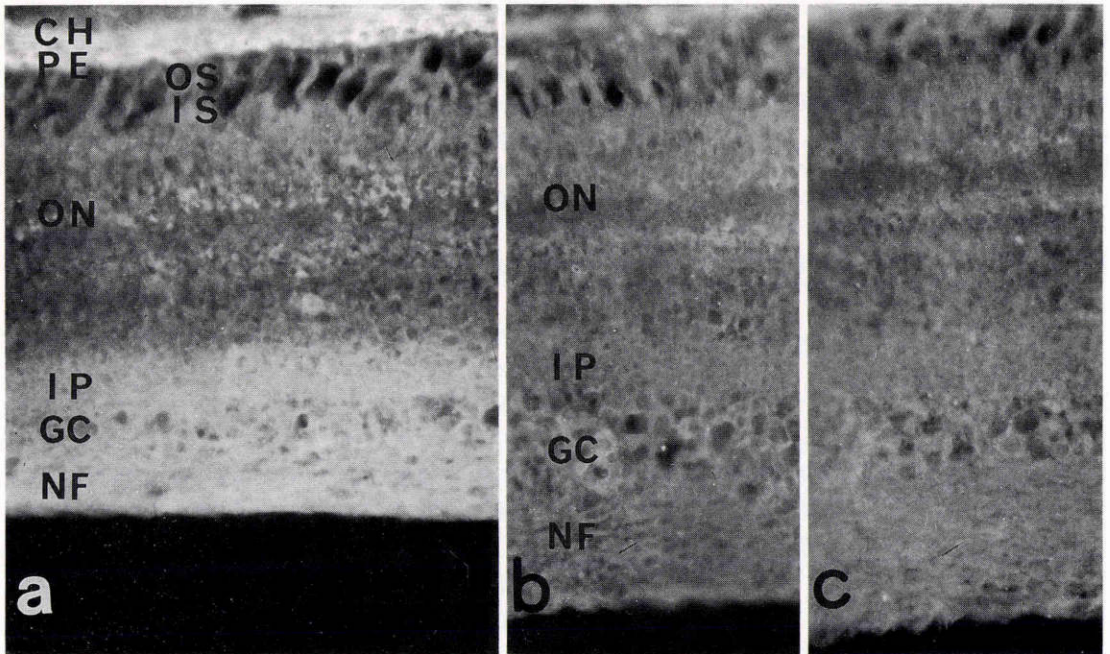


図1 サル蛍光顕微鏡像 (凍結切片) ($\times 300$)

a : 抗 GM1 抗体浸漬, b : 抗アシアロ GM1 抗体浸漬, c : コントロール. a の NF (神経線維層), GC (神経節細胞層), IP (内網状層), CH (脈絡膜) にびまん性の強い蛍光を認めるとともに, ON (外顆粒層) に散在性の点状~円形の強い蛍光を認める. a の PE (色素上皮) の蛍光は, b, c でも認めるため自家蛍光と区別しにくい. OS (外節層) および IS (内節層) は, a, b, c ともに蛍光の強さに差を認めない.

III 結 果

パラフィン包埋切片では、抗 GM1 抗体浸漬切片、抗 アシアロ GM1 抗体浸漬切片ともに、コントロール切片との間に蛍光分布および強さに差はみられず、抗体の特異的反応は検出できなかった。

一方、凍結切片では、抗 GM1 抗体浸漬切片は、コントロール切片との間に蛍光分布および強さに差がみられた。すなわち、抗 GM1 抗体浸漬切片 (図 1a) は、コントロール切片 (図 1c) に比し、神経線維層、神経節細胞層、内網状層および脈絡膜においてびまん性に強い蛍光が観察され、さらに外顆粒層に散在性の点状～円形の強い蛍光を認めた。これらの部位は、GM1 陽性部位と判定された。これに対して、抗 アシアロ GM1 抗体浸漬切片 (図 1b) は、コントロール切片 (図 1c) との間に蛍光分布および強さに差が認められなかったことから、アシアロ GM1 は網膜には陰性であると判定された。なお、視細胞内節・外節領域においては、抗 GM1 抗体、抗 アシアロ GM1 抗体ともに特異的とみなされる反応像は得られなかった。

IV 考 按

アシアロ GM1 の糖鎖は、Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc β 1 \rightarrow 4 Gal β 1 \rightarrow 4 Glc の構造を有し、GM1 はこの糖鎖の末端から 3 番めの Gal にさらにシアル酸が α 2 \rightarrow 3 結合した糖鎖構造を有している。筆者らは、網膜視細胞内節・外節および周囲の IPM に、糖鎖非還元末端に Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc をもつ複合糖質が存在するが、錐体視細胞周囲ではその糖残基が露出しているのに対し、杆体視細胞周囲ではシアル酸が結合してその PNA に対する反応が通常の状態ではマスクされているものと推定している⁴⁾⁵⁾。もし視細胞内節・外節および周囲の IPM にガングリオ系列の糖脂質が存在するならば、抗 アシアロ GM1 抗体が錐体および周囲の IPM に、抗 GM1 抗体が杆体および周囲の IPM にそれぞれ特異的に反応することが期待された。しかしながら、今回の実験において、パラフィン包埋切片のみならず凍結切片でも、両抗体の視細胞および周囲の IPM に対する選択的結合性は観察されなかった。通常、PNA の錐体特異性はパラフィン包埋切片でも強く保持されること³⁾⁴⁾、ガングリオ系列以外に Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc 糖鎖構造を有する糖脂質は生体では存在していないこと⁸⁾、および電気泳動的解析結果⁶⁾⁷⁾などを考え合わせると、視細胞～IPM 領域において PNA で特異的に認

識される複合糖質は、おそらく糖脂質ではなく糖タンパクであろうということが結論される。この点に関しては、酵素処理による同複合糖質の変化から、これらは糖タンパクであろうとする報告⁹⁾もみられ、筆者らの結論と一致している。また、分離杆体外節のガングリオンドを生化学的にしらべた報告によれば、GD1b、GD3 が微量に検出されるだけで、GM1 は検出されていない¹⁰⁾。以上より、視細胞～IPM の PNA 結合性複合糖質は、PNA 結合性糖タンパクとより狭義の用語で呼んでさしつかえないものと思われる。

なお、 β -galactosidase 欠損により GM1 の蓄積する GM1-gangliosidosis では眼底病変として cherry red spot がみられ、組織学的に神経節細胞の細胞質に蓄積像がみられるが、その他の網膜層には異常は認めなかったとの報告がある¹⁾。これによれば、通常網膜では GM1 は神経節細胞だけに分布しているものと推定されるわけであるが、今回の筆者らの実験結果は、GM1 は網膜神経節細胞層だけでなく、神経線維層、内網状層、脈絡膜および一部外顆粒層にも分布することを示しており興味深い。神経線維層～神経節細胞層～内網状層ではびまん性の強い反応像が観察されたのに対し、外顆粒層においては、一部の細胞にのみ散在性の反応像の分布がみられたことはとくに注目に値し、GM1 の分布する細胞の神経節細胞との類似性など、今後の研究で明らかにしていく必要があるであろう。

文 献

- 1) Emery JM, Green WR, Wyllie RG, et al: GM1-gangliosidosis. Ocular and pathological manifestations. Arch Ophthalmol 85: 177—187, 1971.
- 2) Libert J, Toussaint D, Guiselings R: Ocular findings in Nieman-Pick disease. Am J Ophthalmol 80: 991—1002, 1975.
- 3) Uehara F, Sameshima M, Ohba N, et al: Localization of fluorescence-labeled lectin binding sites on photoreceptor cells of the monkey retina. Exp Eye Res 36: 113—123, 1983.
- 4) Uehara F, Muramatsu T, Ohba N, et al: Effects of neuraminidase on lectin binding sites in photoreceptor cells of monkey retina. Jpn J Ophthalmol 29: 54—62, 1985.
- 5) Uehara F, Muramatsu T, Ohba N, et al: Purification of antibody against peanut agglutinin-receptors of bovine interphotoreceptor matrix. Jpn J Ophthalmol 30: 56—62, 1986.
- 6) Uehara F, Muramatsu T, Ohba N, et al: Identification of peanut agglutinin receptors in

- the monkey retina. *Exp Eye Res* 37: 303—305, 1983.
- 7) **Uehara F, Muramatsu T, Ohba N**: Two-dimensional gel electrophoretic analysis of lectin receptors from the bovine interphotoreceptor matrix. *Exp Eye Res* 43: 227—234, 1986.
- 8) 箱守仙一郎: 細胞表面の機能高分子スフィンゴ糖脂質. *サイエンス* 16: 71—83, 1986.
- 9) **Hageman GS, Johnson LV**: Biochemical characterization of the major peanut agglutinin binding glycoproteins in vertebrate retinae. *J Comp Neurol* 249: 499—510, 1986.
- 10) **Hess HH, Stoffyn P, Sprinkle K**: Gangliosides in frog retinal rod outer segment membranes. *J Neurochem* 26: 621—623, 1976.
-